

PCT
ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶ : C07K 16/30, A61K 39/395, 51/10, G01N 33/574, 33/577, C07K 16/46</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 97/33916</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 18 de Septiembre de 1997 (18.09.97)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/CU97/00002</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 12 de Marzo de 1997 (12.03.97)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> 32/96 12 de Marzo de 1996 (12.03.96) CU </div> </p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR (CIM) [CU/CU]; Calle 216 y 15, Atabey, playa, Ciudad Habana 12100 (CU).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): IZNAGA ESCOBAR, Nor- mando Enrique [CU/CU]; Avenida 31 No. 32005 entre 320 y 322, Reparto Juan de Dios Fraga, La Lisa, Ciudad Habana 13500 (CU). MORALES MORALES, Alejo Anto- nio [CU/CU]; Calle Santa Felicia No. 426, Apartamento 4 entre Melones y Rosa Enriquez, Luyanó, 10 de Octubre, Ciudad Habana 13200 (CU). NUÑEZ GANDOLFF, Gilda [CU/CU]; Calle Martí No. 356 entre 27 de Noviembre y Aranguren, Regla, Ciudad Habana 11200 (CU). RAMOS ZUZARTE, Mayra [CU/CU]; Calle Apodaca No. 428 entre General Roloff y Fray Alonso, Guanabacoa, Ciu-</p>		
<p>(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga Lidia; Lex, S.A., Avenida Ira No. 1001, Esquina 10, Miramar, Playa, Ciudad Habana 11300 (CU).</p> <p>(81) Estados designados: BR, CA, CN, JP, MX, US, Patente europaea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publicada <i>Con informe de búsqueda internacional.</i> <i>Antes de la expiración del plazo previsto para la modifi-</i> <i>cación de las reivindicaciones, será publicada nuevamente</i> <i>si se reciben tales modificaciones.</i></p>		

(54) Title: **MONOCLONAL ANTIBODIES IOR C5 FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF COLORECTAL TUMORS**

(54) Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES IOR C5 PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLOR-
RECTALES**

(57) Abstract

The present invention relates to the field of nuclear medicine and in particular to the application of the monoclonal antibody ior C5 for the diagnosis and therapy of colorectal tumors, their metastases and recurrences. To this effect, the present invention provides a composition which contains monoclonal antibodies which recognize the antigen ior C2 and a weak ligand with the reducer agent Sn²⁺ in order to transfer Tc-99m, Re-186, Re-188 and analogs thereof, said composition being useful for the diagnosis by immunogammagraphy and radioimmunotherapy of colorectal tumors, metastases and recurrences.

(57) Resumen

La presente invención se relaciona con la rama de la Medicina Nuclear y en particular con la aplicación del anticuerpo monoclonal ior C5 para el diagnóstico y terapia de tumores colorrectales, sus metástasis y recidivas. Para ello la presente invención proporciona una composición que contiene anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno ior C2 y un ligando débil con el agente reductor Sn²⁺ para realizar la transferencia del Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares, útil para el diagnóstico por inmunogammagrafía y radioinmunoterapia de tumores colorrectales, metástasis y recidivas.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AM	Armenia	GB	Reino Unido	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	México
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Níger
BB	Barbados	GR	Grecia	NL	Países Bajos
BE	Bélgica	HU	Hungría	NO	Noruega
BF	Burkina Faso	IE	Irlanda	NZ	Nueva Zelanda
BG	Bulgaria	IT	Italia	PL	Polonia
BJ	Benín	JP	Japón	PT	Portugal
BR	Brasil	KE	Kenya	RO	Rumania
BY	Belarús	KG	Kirguistán	RU	Federación Rusa
CA	Canadá	KP	República Popular Democrática de Corea	SD	Sudán
CF	República Centroafricana	KR	República de Corea	SE	Suecia
CG	Congo	KZ	Kazajistán	SG	Singapur
CH	Suiza	LI	Liechtenstein	SI	Eslovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Eslovaquia
CM	Camerún	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lituania	SZ	Swazilandia
CS	Checoslovaquia	LU	Luxemburgo	TD	Chad
CZ	República Checa	LV	Letonia	TG	Togo
DE	Alemania	MC	Mónaco	TJ	Tayikistán
DK	Dinamarca	MD	República de Moldova	TT	Trinidad y Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ucrania
ES	España	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finlandia	MN	Mongolia	US	Estados Unidos de América
FR	Francia	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistán
GA	Gabón			VN	Viet Nam

ANTICUERPOS MONOCLONALES IOR C5 PARA EL DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO DE TUMORES COLORRECTALES.

Sector Técnico

- 5 La presente invención se relaciona con la rama de la Medicina Nuclear y en particular proporciona un reactivo y una composición farmacéutica que contienen anticuerpos monoclonales útiles en el marcaje con isótopos radioactivos para el diagnóstico y la terapia de neoplasias malignas.

Técnica anterior

- 10 La utilización de radioisótopos para el marcaje de anticuerpos monoclonales (AcMs) es bien conocida. Estas composiciones pueden ser administradas a los humanos para visualizar o monitorear el funcionamiento de varias partes del cuerpo o para determinar la presencia y localización de determinados antígenos, anticuerpos, hormonas y sus
15 similares.

- También pueden ser utilizadas para el tratamiento de determinados estadios de la enfermedad. Tradicionalmente para estos propósitos se han utilizado una variedad de radionúclidos que incluyen isótopos del Iodo, Indio, Tecnecio y el Renio. Además se conoce que las proteínas pueden ser
20 marcadas con Tc-99m y sus análogos para formar un compuesto que es utilizado para el diagnóstico por imágenes.

- Entre los isótopos más utilizados en Medicina Nuclear el Tc-99m es el más apropiado para aplicaciones en el diagnóstico por imágenes, debido a sus excelentes propiedades como radionúclido (Energía de emisión gamma $E = 140$ Kev, Tiempo de vida media $T_{1/2} = 6.02$ horas), así como, su fácil
25 disponibilidad al obtenerse a partir de un generador de molibdeno-99 (Mo99) en forma de pertecnetato sódico (NaTcO_4). El pertecnetato se mezcla con un agente reductor, como el fluoruro estañoso (SnF_2) con el objetivo de reducir al Tc-99m del estado de oxidación 7^+ , a estados de oxidación 3^+ , 4^+ o 5^+ en
30 presencia de la proteína que ha de ser marcada con el radioisótopo.

Existen dos vías fundamentales para el marcaje de AcMs con Tc-99m: una es la vía indirecta mediante la cual el Agente Quelante Bifuncional (AQBF) se une a la proteína a través de un grupo funcional (en los residuos de lisina y arginina de las cadenas peptídicas) y el Tc-99m se acopla a través del otro grupo funcional o grupo del quelato (Krejcarek G. E. y Tucker K. L., Bioch. and Biophys. Res. Commun. 77, pág. 581-585, 1977).

Otros métodos han sido descritos por diferentes autores (Patentes US No. 4 668 503; US No. 4 479 930 y US No. 4 670 545; Baidoo K. E. et al, Cancer Res. (Suppl.) 50, pág. 799s-803s, 1990).

10 Todos los AQBF tienen sus limitaciones, dentro de las que se incluyen, la complejidad del procedimiento de radiomarcaje, el tiempo que se requiere para acomplejar el radioisótopo y la introducción y presencia de sustancias que pueden afectar la integridad, estabilidad y reconocimiento inmunológico de la proteína.

15 La otra vía es la de marcaje directo, que consiste en utilizar un agente reductor (SnCl_2 , 2-mercaptoetanol (2-ME), ditiotreitól (DTT), ácido ascórbico (AA) y sus similares) para reducir los puentes disulfuros de los residuos de cisteína de la proteína a grupos sulfidrilos (SH), los cuales se conjugan relativamente fácil al Tc-99m debido a su alta capacidad de formar
20 complejos de coordinación.

El primer método directo capaz de lograr una unión fuerte entre la proteína y el Tc-99m para aplicaciones "in vivo" fue el método de pre-estañamiento (Patente US No. 4 424 200). En este método los AcMs se tratan con SnCl_2 en presencia de sales de ftalato y tartrato (pH 5.6) durante
25 21 horas en atmósfera de nitrógeno gaseoso.

La solución antes mencionada se utiliza para reducir los AcMs y por consiguiente exponer los grupos SH reactivos; para proteger los grupos SH reactivos de los AcMs reducidos y prevenir la reformación de los puentes disulfuros; reducir el pertecnetato sódico y acomplejar el Tc-99m reducido y
30 transferirlo a los sitios de unión de los grupos SH en los AcMs reducidos.

Otros autores reducen los puentes de disulfuro de los AcMs con monotioles como el 2-ME o 2-mercaptoetilamina (2-MEA) (Schwarz A. y Steinstrasser A., Journal of Nuclear Medicine 28, p. 721, 1987; Solicitud de Patente Europea No. EP 0 271 806 A2). En estas publicaciones utilizan el
5 Sn^{2+} para reducir el pertecnetato y el Tc-99m reducido lo acomplejan con ligandos débiles como los fosfonatos o pirofosfatos, que son los encargados de transferir el Tc-99m a los sitios de alta afinidad del anticuerpo.

Una variante, modificada del método fue publicada por Mather S. J. y Ellison D. ("Reduction mediated Technetium-99m labeling of Monoclonal
10 antibodies". J. Nucl. Med. 31, pág. 692-697, 1990).

Algunos autores utilizan DTT para reducir los puentes disulfuros del AcM, posteriormente protegen los grupos SH reactivos con Zn^{2+} y otros reactivos que son derivados de grupos sulfidrilos y utilizan sales de tartrato para acomplejar y transferir el radionúclido reducido a los sitios de unión
15 del monoclonal (Patente US No. 4 877 868; Solicitud de Patente Europea No EP 0 237 150).

Otros estudios han sido realizados por este método y en los mismos se utilizaron DTT para reducir los anticuerpos y como acomplejantes sales de tartrato o glucoheptonato y sus análogos (Pak K. Y. et al, J. Nucl. Med. 30,
20 pág. 793, 1989; Solicitud Internacional PCT WO 88/07382).

También ha sido utilizado el ácido ascórbico (AA) para reducir los AcMs a una relación molar de 3500 : 1 (AA : AcM). En este trabajo utilizaron soluciones de ditionita sódica ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) burbujeada con nitrógeno para reducir el pertecnetato y transferirlo a los sitios de unión de los AcMs
25 reducidos alcanzándose eficiencias de marcaje mayores de 95% (Thakur M. L. et al, Nuclear Medicine Biology 18, pág. 227-233, 1991).

Todos los métodos directos de marcaje antes mencionados son ampliamente utilizados en la actualidad debido a que evitan la conjugación de los AcMs con los AQBf como sucede en los métodos indirectos, la
30 reducción es controlada con facilidad, no hay pérdida de la inmunoreactividad de la molécula por su ligando, puede ser adaptable a

procedimiento de marcaje instantáneo y se alcanza una eficiencia de marcaje elevada 95%.

De todos los métodos directos de marcaje, la metodología basada en el uso de 2-ME para el radiomarcaje cuantitativo de AcMs con Tc-99m sin pérdidas en la integridad de la molécula, ni en su actividad biológica ha sido bien documentada y actualmente es la más apropiada para estudios clínicos (Baum R. P. et al, Nucl. Med. Communications 10, pág. 345-352, 1989).

Han sido probadas diferentes formas de tratamiento del carcinoma colorectal siendo la resección quirúrgica del tumor la única que ha resultado curativa. La cirugía permite alcanzar altos porcentos de sobrevida en los casos que son detectados tempranamente, pero desafortunadamente la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas en las que el tumor ya ha hecho metástasis.

Actualmente la estrategia a seguir para aumentar la sobrevida general ante la enfermedad abarca el diagnóstico, la terapéutica y la epidemiología. Los investigadores están evaluando métodos que permitan diagnosticar precozmente la enfermedad, o sea, en estados en que aún no se haya producido la diseminación hacia las capas más externas del órgano, etapas en las que aún es quirúrgicamente curable. De la misma forma el conocimiento de los factores epidemiológicos y el desarrollo de nuevos métodos terapéuticos más eficaces contribuirán al incremento de la sobrevida.

El uso de anticuerpos monoclonales (AcMs) marcados con isótopos radioactivos para la detección del cáncer por métodos inmunogammagráficos ha centrado la atención en los proyectos de investigación de los últimos años. Los AcMs han mostrado potencial suficiente para servir como portadores de radioisótopos y dirigirlos hacia los antígenos tumor asociados.

La utilización de composiciones con anticuerpos marcados con isótopos radioactivos, los cuales emiten radiaciones en niveles que pueden ser detectadas después de ser administradas en humanos es bien conocida.

(Mach J. P. et al, Sem. in Nucl. Med. 19, pág. 262-281, 1989; Behr T. M. et al, J. Nucl. Med. 36, pág.430-441, 1995). Estas composiciones son utilizadas para visualizar y monitorear el funcionamiento de varias partes del cuerpo humano o son utilizadas en el diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de determinados antígenos, anticuerpos, hormonas y sus similares.

Algunos anticuerpos radiomarcados han sido utilizados para detectar tumores que están asociados con el antígeno carcinoembrionario (CEA). Los anticuerpos contra el CEA marcados con I-131 o I-125 son utilizados para detectar tumores que producen CEA o están asociados con este marcador (Patentes US No. 3 663 684, US No. 3 867 363 y US No. 3 927 193). También se conoce que los AcMs pueden ser marcados con Tc-99m con el objetivo de conformar agentes para el diagnóstico "in vivo".

Los AcMs ior C5, anticuerpos de origen murino de isotipo IgG1 generados a partir de la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la línea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14 (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992), reconocen un antígeno expresado preferencialmente en la superficie y citoplasma de células colorrectales malignas y normales. No reconocen a los antígenos CEA, Lewis a, Lewis b, Lewis a sialilado, ni a los antígenos de membrana de las células mononucleares periféricas, ni de los glóbulos rojos.

Estudios de western blotting utilizando extractos de membrana de la línea SW1116 mostraron que estos AcMs reconocen un complejo glicoproteico al que se denominó ior C2, compuesto por una banda mayor de 145 KDa y una menor de 190 KDa (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993).

Estos AcMs reconocen en tejidos humanos normales determinantes epiteliales de distribución restringida que están predominantemente expresados en el canal alimentario y sus derivados embriológicos. Reconocen además todas las vellosidades intestinales, en el intestino grueso

el patrón es homogéneo y en pulmón reconoce los bronquios (marcaje del epitelio respiratorio pseudoestratificado ciliado y marcaje de células caliciformes).

La inmunotinción de las células de la mayoría de las glándulas de los adenocarcinomas del colon, varía marcadamente en intensidad dentro del mismo tumor, resultando en un patrón de marcaje inmunohistoquímico heterogéneo. El marcaje es apical y en general marca el mucus de las células caliciformes y el material secretado intraluminalmente.

El marcaje positivo y la identificación del antígeno por métodos de western blotting e inmunohistoquímicos en un grupo heterogéneo de células cancerígenas, su marcaje heterogéneo en los tejidos de adenocarcinomas colorrectales y su expresión homogénea en la mucosa normal en estudios realizados "in vitro" sugieren que:

a) el antígeno en cuestión es único y que es sintetizado por las células malignas de colon

b) puede ser utilizado para el diagnóstico de tumores colorrectales, metástasis y recidivas por métodos inmunogammagráficos.

Mientras que el marcaje de los anticuerpos por C5 con peroxidasa y con fluoresceína son muy efectivos para la identificación y localización de células tumorales "in vitro", estas composiciones marcadas no son apropiadas para uso "in vivo" debido a que no permiten la visualización por ninguno de los sistemas de detección existentes que utilizan métodos inmunogammagráficos y por consiguiente, no tienen un amplio uso ya que están simplificados sólo a técnicas inmunohistoquímicas que requieren de microscopio óptico o electrónico, para la identificación positiva de las muestras de biopsias.

Otra de las posibles consecuencias desfavorables que aparecen con los antígenos tumor asociados, es que al utilizar anticuerpos monoclonales radiomarcados, donde éstos se unen directamente a las células tumorales que expresan este antígeno pueden obtenerse imágenes imperfectas debido a la baja sensibilidad de las células tumorales, ya que el anticuerpo

frecuentemente tiene un número limitado de sitios de unión. De este modo, la célula solamente puede ser capaz de acomodar una molécula de anticuerpo radiomarcado en un sólo sitio antigénico. Así, la densidad de moléculas radiomarcadas en la superficie de la célula puede no ser suficiente para distinguir la célula tumoral del resto de las células en los tejidos, debido a la baja especificidad.

Hasta el momento actual no se ha reportado ningún estudio en el que se describa la localización del antígeno ior C2 en las células tumorales, metástasis y/o recidivas por métodos inmunogammagráficos fundamentalmente, utilizando anticuerpos monoclonales contra este antígeno, marcados con Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares.

La novedad de la presente invención consiste en proporcionar una composición que contiene anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno tumor asociado ior C2, en particular, los anticuerpos monoclonales ior C5, así como sus variantes quiméricas y humanizadas, y un ligando débil con el agente reductor Sn^{2+} para realizar la transferencia de los radiomarcadores Tc-99m, Re-186, Re-188 y sus similares. Dicha composición es útil para la radioinmunoterapia y el diagnóstico por inmunogammagrafía de tumores colorrectales, metástasis y recidivas.

Además, con los datos obtenidos a partir de estudios realizados "in vivo" se demuestra que el patrón de biodistribución del antígeno C2 observado en humanos con la composición de la presente invención es diferente al reportado en estudios anteriores *in vitro* empleando los anticuerpos monoclonales ior C5 (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993). En estos estudios se había observado la presencia de dicho antígeno tanto en células normales como en células malignas. Con el empleo de la composición de la presente invención se logra una distinción selectiva de las células afectadas en relación a las células normales, ya que sólo son radiomarcadas las células malignas lo que hace presumir una localización intracitoplasmática de dicho antígeno en las células normales y superficial en el caso de las células malignas. Este hallazgo hace a la

presente solución técnica muy útil para su empleo en métodos de detección "in vivo" empleando técnicas inmunogammagráficas.

Divulgación de la Invención

1. Obtención del AcM.

5 Los AcMs ior C5 son anticuerpos de origen murino con alta especificidad, de isotipo IgG1 que reconocen al antígeno C2 altamente expresado en la superficie y en el citoplasma de las células colorrectales normales y malignas respectivamente. Los AcMs ior C5 fueron obtenidos por la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana
10 SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la línea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14. Su generación, caracterización y reactividades han sido descritas en detalles por Vázquez A. M. y colaboradores (Hybridoma 11, pág. 245-256, 1992). El hibridoma productor de dichos anticuerpos monoclonales ha sido
15 depositado bajo las regulaciones del Tratado de Budapest a los fines de la presente solicitud de patente (No. de depósito pendiente de recibir).

2. Purificación de los AcMs.

Estos anticuerpos son purificados a partir de Líquido Ascítico Murino (LAM). El LAM se filtra por un filtro de Policarbonato (Sartorius) con 50 mm
20 de diámetro, después se pasa por un prefiltro (Filtro de Fibras de Cristal) para la remoción de partículas gruesas y posteriormente se filtra a través de membranas de acetato de celulosa de 0.8 μ m y 0.45 μ m.

El LAM se diluye con igual volumen de Tampon Glicina 1.5 M, NaCl 3M pH 8.9 y para la purificación se utiliza una columna XK 26/20 (área 5.3
25 cm²) empacada con 50 ml de gel de Proteína A sepharosa 4 Fast Flow y se aplica igual volumen de la muestra que de Tampon a eluir a 80 cm/h (7 ml/min).

La columna se equilibra previamente con al menos 5 volúmenes de lecho. Después de la aplicación la columna se lava con 5-10 volúmenes de lecho de
30 gel del tampon anterior. La elución se realiza con Tampón Citrato (Acido

Citríco) 0.1 M pH 6.0 a una velocidad de 60 cm/h (5.3 ml/min) y la columna se regenera con Tampón Citrato 0.1 M pH 3.0 a una velocidad de 80 cm/h.

La fracción eluida se pasa por una columna XK 50/30 empacada con sephadex G-25 M en tampón fosfato salino (PBS) y la fracción de proteína eluida de este paso se filtra en condiciones asépticas bajo un flujo laminar con una membrana de 0.22 μ m.

Por último las fracciones recolectadas de 8 batch diferentes se mezclan y se concentran en cartuchos de hemodiálisis hasta que la concentración de los AcMs alcanza un valor de 5 mg/ml medida por mediciones de densidad óptica (DO) a 280 nm. A los purificados se le realizan los controles de calidad siguientes: concentración de proteínas por Método Lowry, concentración de proteínas por DO a 280 nm, actividad biológica por método ELISA de competencia, electroforesis (pureza), focalización isoelectrica (punto isoelectrico) y se mide la estabilidad de los AcMs.

3. Obtención de Anticuerpos Monoclonales Quiméricos.

- Clonaje de la Secuencia Molecular:

Las cadenas VH y VK fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos. El DNA complementario (cDNA) purificado de las cadenas VH y VK fue clonado en el vector M13. Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). Las secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

- Construcción de los genes quiméricos:

Se reamplifica el cDNA por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los cDNA amplificados fueron digeridos con PstI y BstEII para el gen de VH y con PvuII y BglII para el gen de VK. Los fragmentos se clonaron en el vector M13-VHPCR1 (digeridos con PstI y BstEII) o en el vector M13-VKPCR1 (digerido con PvuII y BclI). Los detalles de los vectores son referidos en Orlandi, R. y colaboradores (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). El M13VHPCR-C5 y M13VKPCR-C5 que contienen los insertos de los genes V fueron identificados directamente por la secuenciación.

El gen VH conjuntamente con el promotor de la cadena pesada de la Ig y los sitios apropiados del DNA splicing y la secuencia del péptido señal fueron cortados de los vectores M13 por digestión con HindIII y BamHI y clonados en un vector de expresión (pSVgpt). Entonces la región constante de la IgG1 humana (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) fue adicionada como un fragmento BamHI. La construcción resultante fue C5VH-pSVgpt. La construcción de C5VK-pSVhyg fue esencialmente la misma excepto que el gen gpt fue reemplazado por el gen de resistencia a la higromicina y se adicionó la región constante de la cadena Kappa humana (Heiter, P. A. et al, Cell 22:197-207, 1980)

- Expresión del vector quimérico y el humanizado en células NSO.

Las células NSO fueron electroporadas con 4 µg de la región gamma 1 del vector quimérico C5VH-CMMAR y 8 µg de la región constante kappa del quimérico C5VK-CMMARhyg, fueron liberalizados por digestión con PVUI. Los DNA fueron mezclados, precipitados en etanol y disueltos en 25 µl de agua. Aproximadamente 10⁷ células NSO fueron crecidas hasta la semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5 ml DMEN conjuntamente con el DNA digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó un pulso de 170 volts y 960 µF (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejan en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % suero fetal bovino y se dejan a que se recobren por 48 horas. Después las células fueron distribuidas placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 0.8 µg/ml de ácido micofenólico, 250 µg/ml de xanthine). Los clones transfectados se detectaron visualmente 14 días después. La presencia de los anticuerpos quiméricos y humanizados en el medio de los pozos que contienen los clones transfectados fue medida por ELISA. Las placas de Microtítulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado goat anti-human IgG, cadena gamma específica (Sera Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 µl de medio de cultivo de

las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el conjugado con peroxidasa goat anti-human Kappa, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se
5 incuba a 37°C durante 1 hora. Se bota el contenido de los pozos y éstos se lavan con PBST y se adiciona el buffer sustrato que contiene o-phenyldiamine. Las reacciones fueron detenidas después de unos minutos añadiendo ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 492 nm.

4. Obtención y utilización de una composición radiomarcada para el 10 diagnóstico y/o terapia de tumores colorectales.

La obtención de la composición radiomarcada de la presente invención se obtiene utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos ior C5 concentrados por ultrafiltración en Centricon-30 (Amicon, MA) en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 son reducidos por el
15 método descrito en la Solicitud de Patente Europea EP No. 0 271 806 A2, a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos reducidos fueron purificados para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech,
20 Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración de los anticuerpos reducidos se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

25 Alícuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina
30 burbujeada con nitrógeno. 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de los anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP,

fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 μg por mg de anticuerpos respectivamente. La solución con los AcMs reducidos y el ligando débil se congela en nitrógeno líquido de nuevo y los productos congelados se liofilizaron por 24 horas, sellados al vacío y se guardan a 4°C hasta su uso.

La composición objeto de la presente invención comprende dos componentes básicos:

1. Los anticuerpos monoclonales ior C5, sus variantes quiméricas o humanizadas, fragmentos y/o derivados de éstos.
2. Un agente reductor capaz de reducir al Tc-99m de Tc (7^{+}) a Tc(5^{+}), Tc(4^{+}) y un acomplejante débil para realizar el intercambio del Tc-99m con el anticuerpo.

Las ventajas fundamentales de la composición de acuerdo con la invención es que entre sus componentes incluye un agente reductor para reducir al Tc-99m del estado de oxidación 7^{+} a los estados de oxidación 5^{+} , 4^{+} y 3^{+} , los cuales son fisiológicamente aceptables y el uso puede ser llevado a cabo con un proceso de intercambio con un ligando débil para unir el Tc-99m o sus análogos a la preparación de anticuerpo deseada.

El Tc-99m debe ser adicionado a la composición por el usuario previo a la administración a humanos. La utilización del Tc-99m ofrece imágenes excelentes por inmunogammagrafia. El Tc-99m se retiene por los AcMs por un mecanismo de quelatos y el radiofármaco se forma bajo condiciones de reducción para minimizar o prevenir la reacción irreversible a través de la cual el Tc-99m se separa de los AcMs. El Tc-99m se puede obtener como pertechnetato sódico desde un generador convencional de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cualquier fuente de Tc-99m con calidad farmacéutica puede ser utilizado en la presente invención.

5. Obtención de la composición farmacéutica.

La composición farmacéutica de la presente invención se obtiene utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos por C5 concentrados por ultrafiltración en Centricon-30 (Amicon, MA) en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 fue reducido por el método descrito (Schwarz y Steinstrasse, 1987 y modificado por Mather y Ellison, 1990) a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo reducido se purificó para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración del anticuerpo reducido se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP, fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50, 3.4 y 20 µg por mg de anticuerpos respectivamente.

Esta solución que contiene los AcMs reducidos y el ligando débil se utiliza en forma liofilizada o se prepara al instante, y para el radiomarcaje se reconstituye con 0.1-100 mCi (3.7- 3700 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4$ (por cada mg de AcMs) como eluato del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Elumatic II Amersham, UK) y se espera durante 15 minutos a temperatura ambiente para alcanzar una alta eficiencia de marcate.

Control de la Calidad de Radiomarcaje.

El control de calidad se realiza por cromatografía de papel ascendente (Whatman 3 MM)

6. Radiomarcaje de Fragmentos.

Los fragmentos F(ab')₂ de los AcMs también pueden ser marcados por el método descrito anteriormente. El fragmento F(ab')₂ se obtiene por digestión
5 de los AcMs con pepsina seguido de una purificación cromatográfica que separa los fragmentos F(ab')₂ del resto de los subproductos de la digestión con pepsina.

Posterior al paso de purificación se realiza el proceso de reducción de los puentes disulfuro en el fragmento según el método descrito anteriormente,
10 se realiza el paso de purificación por una columna de filtración en gel PD-10 Sephadex G-25 M para eliminar el exceso de 2-ME, se determina la concentración de los fragmentos reducidos por mediciones de densidad óptica a 280 nm como se describe arriba, se determinan los números de grupos sulfidrilos por molécula de fragmento, se le añade la solución de
15 reducción del pertecnetato y por último se le adiciona la cantidad deseada de pertecnetato sódico.

7. Determinación de la inmunorreactividad de los AcMs reducidos.

En la presente invención se utiliza un sistema ELISA de competencia con el antígeno y se comparan los AcMs nativos (no reducidos) y los reducidos
20 utilizando curvas patrones con concentraciones decrecientes de los AcMs. Se calculan las constantes de afinidad para las concentraciones correspondiente al 50 % de inhibición y se determina si son similares las afinidades entre los AcMs nativos y los reducidos.

Por este método se determina que el proceso de reducción de los
25 anticuerpos y sus fragmentos con 2-ME, seguido de la purificación a través de una columna de filtración en gel PD-10 sephadex G-25 M, no afecta la inmunorreactividad de los anticuerpos y sus fragmentos, ni su reconocimiento por el antígeno, ni provoca cambios estructurales en la integridad de la molécula.

8. Monitoreo de la composición farmacéutica.

La unión selectiva de la composición farmacéutica a las células tumorales de colon y recto, metástasis y recidivas que expresan el antígeno ior C2, una vez administrada por vía endovenosa a humanos se monitorea por métodos
5 inmunogammagráficos a través de una cámara gamma.

Se realizan imágenes planas con vista anterior y posterior de la cabeza, tórax, hígado y pelvis con ayuda de una cámara gamma. Se realizan adquisiciones a 1, 2, 3, 5 y 24 horas, utilizando una estadística de 700 000 conteos por adquisición. Las imágenes se guardan en la computadora en
10 una matrix de 128x128 para su posterior utilización.

La acumulación de los AcMs ior C5 en las células tumorales se determina por estas imágenes inmunogammagráficas con vistas planas anteriores y posteriores.

9. Monitoreo de la biodistribución de la composición.

15 La biodistribución en órganos normales de la composición de la presente invención se monitorea a través de imágenes de cuerpo completo que se obtienen utilizando una Cámara Gamma ajustada con colimador de energía media de alta resolución para incrementar las vistas laterales. Las imágenes se adquieren utilizando una ventana de 20 % centrada en 140 Kev que es la
20 energía de emisión del Tc-99m.

Se adquieren imágenes de cuerpo completo con vistas anteriores y posteriores a los 10 minutos, 1, 3, 5 y 24 horas después de administrado el radiofármaco utilizando el gantry a una velocidad de 20 cm/min. Los tiempos de adquisición son de aproximadamente entre 20-25 minutos cada
25 uno.

Las imágenes de cuerpo completo se graban en una computadora en matrix de 512x2048 para su posterior procesamiento.

La invención se describe con más detalles por medio de los siguientes
30 ejemplos.

EJEMPLO 1: Preparación de los anticuerpos monoclonales ior C5.

Los anticuerpos monoclonales ior son anticuerpos de origen murino de isotipo IgG1, los cuales fueron obtenidos mediante la inmunización de ratones Balb/c con la línea celular de cultivo humana SW1116 (adenocarcinoma colorrectal) y la fusión de los esplenocitos del ratón seleccionado con la línea de mieloma murino no secretora SP 2/O Ag14 y se purificaron por cromatografía de afinidad en Proteína A sepharosa 4 Fast Flow.

El hibridoma productor de dichos anticuerpos monoclonales ha sido depositado bajo las regulaciones del Tratado de Budapest a los fines de la presente solicitud de patente (No. de depósito pendiente de recibir).

EJEMPLO 2. Obtención de los Anticuerpos Monoclonales Quiméricos.**- Clonaje de la Secuencia Molecular:**

Las cadenas VH y VK fueron amplificadas por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos. El DNA complementario (cDNA) purificado de las cadenas VH y VK fue clonado en el vector M13. Doce clones independientes fueron secuenciados por el método del dideoxido utilizando T7 DNA Pol (Pharmacia). Las secuencias de VH y VK tienen alta relación con el subgrupo 2 de Kabat.

- Construcción de los genes quiméricos:

Se reamplifica el cDNA por PCR utilizando oligonucleótidos específicos. Los cDNA amplificados fueron digeridos con PstI y BstEII para el gen de VH y con PvuII y BglII para el gen de VK. Los fragmentos se clonaron en el vector M13-VHPCR1 (digeridos con PstI y BstEII) o en el vector M13-VKPCR1 (digerido con PvuII y BclI). Los detalles de los vectores (Orlandi, R et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). El M13VHPCR-C5 y M13VKPCR-C5 que contienen los insertos de los genes V fueron identificados directamente por la secuenciación.

El gen VH conjuntamente con el promotor de la cadena pesada de la Ig y los sitios apropiados del DNA splicing y la secuencia del péptido señal

fueron cortados de los vectores M13 por digestión con HindIII y BamHI y clonados en un vector de expresión (pSVgpt). Entonces la región constante de la IgG1 humana (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) fue adicionada como un fragmento BamHI. La construcción resultante fue C5VH-pSVgpt. La construcción de C5VK-pSVhyg fue esencialmente la misma excepto que el gen gpt fue reemplazado por el gen de resistencia a la higromicina y se adicionó la región constante de la cadena Kappa humana (Heiter, P. A. et al, Cell 22:197-207, 1980)

- Expresión del vector quimérico y el humanizado en células NSO.

Las células NSO fueron electroporadas con 4-8 µg de la región gamma 1 del vector quimérico C5VH-CMMAR y 8-16 µg de la región constante kappa del quimérico C5VK-CMMARhyg, fueron liberalizados por digestión con PVUI. Los DNA fueron mezclados, precipitados en etanol y disueltos en 25 µl de agua. Aproximadamente 10^7 células NSO fueron crecidas hasta la semiconfluencia, obtenidas por centrifugación y resuspendidas en 0.5-1.0 ml DMEN conjuntamente con el DNA digerido en una cubeta de electroporación. Después de 5 minutos en hielo, a las células se les aplicó un pulso de 170 volts y 960 µF (Gene-Pulser, Bio-Rad) y se dejan en hielo por 30 minutos. Las células fueron colocadas en 20 ml DMEN más 10 % suero fetal bovino y se dejan a que se recobren por 48 horas. Después las células fueron distribuidas placas de 96 pozos y se les aplicó medio selectivo (DMEN, 10 % suero fetal bovino, 0.8 µg/ml de ácido micofenólico, 250 µg/ml de xanthine). Los clones transfectados se detectaron visualmente 14 días después. La presencia de los anticuerpos quiméricos y humanizados en el medio de los pozos que contienen los clones transfectados fue medida por ELISA. Las placas de Microtítulos de 96 pozos para ELISA fueron recubiertas con el conjugado goat anti-human IgG, cadena gamma específica (Sera, Lab). Después de lavarse con PBST (phosphate buffered saline) que contiene 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 µl de medio de cultivo de las placas que contienen los transfectomas se le adicionaron a cada pozo de la placa de microtítulos 1 hora a 37°C.

Después las placas se lavan con PBST y se adiciona el conjugado con peroxidasa goat anti-human Kappa, cadena ligera específica (Sera-Lab) y se incuba a 37°C durante 1 hora. Se bota el contenido de los pozos y éstos se lavan con PBST y se adiciona el buffer sustrato que contiene o-phenyldiamine. La reacciones fueron detenidas después de unos minutos
5 añadiendo ácido sulfúrico y se midió la absorbancia a 492 nm.

EJEMPLO 3 : Proceso de obtención de una composición radiomarcada por el método directo de marcaje.

10 Los anticuerpos ior C5 obtenidos según el procedimiento del Ejemplo 1 fueron reducidos en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Solicitud de Patente Europea No. 0 271 806 A2) a través de una reducción con 2-mercaptoetanol (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Los anticuerpos reducidos se
15 purificaron para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración de dichos anticuerpos reducidos se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia,
20 Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido. Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham. UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro
25 estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada 1 mg de anticuerpos reducidos para dar una concentración de MDP, fluoruro estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 µg por mg de anticuerpos respectivamente. La solución con los AcMs reducidos
30 y el ligando débil se congela en nitrógeno líquido de nuevo y los productos

congelados se liofilizaron por 24 horas, sellados al vacío y se guardan a 4°C hasta su uso.

EJEMPLO 4 : Obtención de la composición farmacéutica.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se obtiene utilizando la siguiente metodología :

Los anticuerpos ior C5 obtenidos según el procedimiento del Ejemplo 1 se redujeron en tampón fosfato salino (PBS) pH 7.4 (Solicitud de Patente Europea No. 0 271 806 A2) a través de una reducción con 2-mercaptoetanol
10 (2-ME) a una relación molar en exceso de 2000:1 (2-ME : AcMs), a temperatura ambiente durante 30 minutos. El anticuerpo reducido se purificó para eliminar el exceso de 2-ME usando una columna Sephadex G-25 M (Pharmacia Biotech, Suecia) y PBS pH 7.4 burbujeado con nitrógeno como fase móvil. Se colectaron fracciones de 2 ml y la concentración del
15 anticuerpo reducido se determinó por mediciones de densidad óptica a 280 nm en un espectrofotómetro UV/Visible (Ultrospec, Pharmacia, Suecia). La concentración de la proteína resultó ser de 2.5-5.0 en el pico.

Alicuotas de 1-10 mg de los anticuerpos reducidos se dispensaron en viales de 10 ml y se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido.
20 Después se reconstituyó el Kit MDP comercial Amerscan Medronate II (Amersham, UK, que contiene 5 mg de ácido medrónico, 0.34 mg de fluoruro estañoso y 2 mg sodium p-aminobenzoate) con 5 ml de solución salina burbujeada con nitrógeno, 50-100 µl de esta solución se añadieron por cada
1 mg de anticuerpo reducido para dar una concentración de MDP, fluoruro
25 estañoso y ácido p-aminobenzoico de 50-100, 3.4-6.8 y 20-40 µg por mg de anticuerpos respectivamente.

Esta solución que contiene los AcMs reducidos y el ligando débil se utiliza en forma liofilizada o se prepara al instante, y para el radiomarcaje se reconstituye con 0.1-100 mCi (3.7- 3700 MBq) de $^{99m}\text{TcO}_4$ (por cada mg de
30 AcMs) como eluato del generador $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Elumatic II Amersham, UK)

y se espera durante 15 minutos a temperatura ambiente para alcanzar una alta eficiencia de marcaje.

EJEMPLO 5 : Radiomarcaje de fragmentos F(ab')₂ del AcM ior C5.

5 El fragmento F(ab')₂ se obtuvo por digestión del AcM con pepsina seguido de una purificación cromatográfica que separó los fragmentos F(ab')₂ del resto de los subproductos de la digestión con pepsina y la pureza que se obtuvo después de la purificación fue mayor del 95 %.

El método descrito en el Ejemplo 3 se empleó para la reducción de los
10 puentes disulfuro en el fragmento, donde además se incluyó el paso de purificación usando la columna de filtración en gel PD-10 Sephadex G-25 M y la solución de reducción del pertecnetato.

**EJEMPLO 6 : Determinación de la inmunorreactividad de los AcMs
15 reducidos.**

Este ejemplo ilustra que en la presente invención usando el 2-ME como agente reductor del ejemplo 2 seguido de la purificación a través de una columna de filtración en gel PD-10 sephadex G-25 M, no se afecta la inmunorreactividad de los AcMs.

20 Se utilizó un sistema ELISA de competencia con el antígeno y se compararon los AcMs nativos (no reducidos) y los reducidos utilizando curvas patrones con concentraciones decrecientes de los AcMs. Se calcularon las constantes de afinidad para la concentración correspondiente al 50 % de inhibición y se encontró que eran similares entre el AcMs nativos
25 y los reducidos.

EJEMPLO 7 : Unión de los anticuerpos ior C5 marcados con Tc-99m a las células de cáncer colorrectal.

Las imágenes planas con vista anterior y posterior de la cabeza, tórax,
30 hígado y pelvis fueron realizadas en una cámara gamma. Imágenes a la 1, 2,

3, 5 y 24 horas fueron adquiridas utilizando una estadística de 700 000 conteos por adquisición.

Las imágenes fueron guardadas en la computadora en una matrix de 128x128 para su posterior utilización. La acumulación de los AcMs por C5 en las células tumorales se determinó por estas imágenes inmunogammagráficas con vistas planas anteriores y posteriores. Las imágenes adquiridas en los intervalos de tiempos antes mencionados muestran claramente como con los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden ser detectados durante las primeras tres horas después de administrado el radiofármaco tumores en el colon ascendente, colon descendente y en el canal anal, así como metástasis hepáticas y en ángulo esplénico, lesiones no vistas antes por otros métodos imageológicos como los Rayos X, el Ultrasonido, la Tomografía Axial Computadorizada (CAT Scans) y la Resonancia Magnética Nuclear (NMR). La gran selectividad de estos anticuerpos por los tumores colorrectales, sus metástasis y recidivas propicia que a las 24 hrs después de administrado el radiofármaco en las lesiones se localizan entre un 1 y 3 % de la dosis inyectada por cada 100 g de tumor.

EJEMPLO 8 : Biodistribución en órganos normales de los anticuerpos por C5 marcado con Tc-99m.

Imágenes de cuerpo completo fueron obtenidas usando una Cámara Gamma ajustada con colimador de energía media de alta resolución para incrementar las vistas laterales. Las imágenes fueron adquiridas utilizando una ventana de 20 % centrada en 140 Kev que es la energía de emisión del Tc-99m. Imágenes de cuerpo completo anterior y posterior fueron adquiridas a los 10 minutos, 1, 3, 5 y 24 horas después de administrado el radiofármaco utilizando el gantry a una velocidad de 20 cm/min. Los tiempos de adquisición fueron aproximadamente de 25 minutos cada uno. Las imágenes de cuerpo completo fueron grabadas en una computadora en matrix de 512x2048 para su posterior procesamiento.

Con ayuda de regiones de interés que se dibujaron sobre los principales órganos fuentes se determinaron los patrones de biodistribución en órganos normales, los cuales mostraron que durante las primeras 5 horas después de administrado el radiofármaco la mayor parte de la actividad se encuentra en el torrente sanguíneo y en los órganos parenquimatosos. Sólo un bajo porcentaje de la actividad se excreta en las primeras horas por orina.

Entre las 1 y 5 horas se observó buen contraste en los pulmones, el hígado y los riñones, así como disminución de la perfusión de los músculos periféricos, aunque la actividad en el torrente sanguíneo continuó elevada.

10 Las imágenes tomadas a las 24 horas después de la inyección muestran una actividad baja en sangre y en el cuerpo completo (Tabla 1).

Tabla 1: Biodistribución en órganos normales de los AcMs ior C5 marcados con Tc-99m.

Órgano Fuente	% de la Dosis Inyectada				
	10 min	1 hr	3 hr	5 hr	24 hr
Corazón	7.9	6.8	4.5	3.8	0.3
Higado	9.4	8.3	6.0	5.3	0.6
Bazo	1.4	1.2	0.5	0.7	0
Riñones	3.7	3.6	2.4	2.6	0.2
Vejiga	0.5	0.4	0.4	0.8	0.0
Pulmones	4.0	3.5	2.3	2.05	0.1
Resto Cuerpo	67.9	58.8	48.0	38.5	1.0
Cuerpo Entero	100	87.0	67.7	56.5	2.6

- 5 Con estos datos obtenidos en estudios "*in vivo*" se demuestra que el patrón de biodistribución del antígeno C2 observado en humanos con la composición de la presente invención es diferente al reportado en estudios anteriores empleando los anticuerpos monoclonales ior C5 (Vázquez A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pág. 137-145, 1993). En estos
- 10 estudios se había observado la presencia de dicho antígeno tanto en células normales como en células malignas. Con el empleo de la composición de la presente invención se logra una distinción selectiva de las células afectadas en relación a las células normales, ya que sólo son radiomarcadas las células malignas lo que hace presumir una localización intracitoplasmática
- 15 de dicho antígeno en las células normales y superficial en el caso de las células malignas. Este hallazgo hace a la presente solución técnica muy útil para su utilización en métodos de detección inmunogammagráficos.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno ior C2 presente en tumores malignos de colon y recto, epitopes similares al mismo, mezcla de éstos o cualesquiera antígeno tumor asociado relacionado con dicho antígeno caracterizados por ser útiles en el diagnóstico y/o tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
2. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizados porque son los anticuerpos monoclonales murinos C5 así como cualquier variante humanizada o quimérica obtenida a partir de ellos.
3. Anticuerpos monoclonales según las reivindicaciones 1 y 2 caracterizados porque los anticuerpos monoclonales murinos C5 son obtenidos a partir del hibridoma de igual nombre (Número de Depósito pendiente).
4. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizado porque son anticuerpos antiidiotipo generados por los anticuerpos monoclonales de la reivindicación 2.
5. Anticuerpos monoclonales según la reivindicación 1 caracterizado porque son anticuerpos anti-antiidiotipo que reconocen al antígeno ior C2.
6. Uso de los anticuerpos de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la fabricación de una composición farmacéutica útil en el tratamiento tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
7. Uso de los anticuerpos de las reivindicaciones de la 1 a la 5 para la fabricación de una composición útil para la localización e identificación "in vivo" de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas.
8. Composición farmacéutica para el tratamiento de tumores malignos de colon y recto, sus metástasis y recidivas caracterizada porque

MONOCLONAL ANTIBODIES IOR C5 FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT
OF COLORECTAL TUMORS.

Technical Sector

5 The present invention is related with the field of Nuclear
Medicine and particularly provides a reagent and a
pharmaceutical composition that contain monoclonal antibodies
useful in the labeling with radioisotopes, for the diagnosis
and therapy of malignant neoplasms.

10 **Prior art**

The use of radioisotopes for labeling of monoclonal
antibodies (Mabs) is well known. These compositions can be
administered to the humans to visualize or monitor functioning
of various parts of the body to determine the presence and
15 localization of particular antigens, antibodies, hormones and
their like.

They can also be used in the treatment of various disease
states. Traditionally for these purposes a variety of
radioisotopes, including isotopes of iodine, indium,
20 technetium and rhenium have been used. It is also known that
proteins can be labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) to form a
reagent that is used for diagnostic imaging.

Among the most widely used isotopes in nuclear medicine,
 ^{99m}Tc is the most appropriated for applications in diagnostic
25 imaging, due to its excellent properties as radionuclide
(Gamma emission $E_\gamma = 140 \text{ Kev}$, Half-life $T_{1/2} = 6.02 \text{ hrs}$), as
well as its ready availability to be obtained as a sodium
pertechnetate from a molybdenum-99 generator. The sodium
pertechnetate is mixed with a reducing agent, such as
30 stannous fluoride (SnF_2), in order to reduce the ^{99m}Tc from the
oxidation state 7^+ , to a low oxidation states 3^+ , 4^+ or 5^+ in
presence of the protein which is to be radiolabeled.

There are two general approaches for the radiolabeling of Mabs with ^{99m}Tc . One approach is indirect in which a bifunctional chelating agent (BFCA) is attached to the protein via one functional group (lysine and arginine residues of the peptide chains) and ^{99m}Tc is attached via the other functional, or chelating group (Krejcarek G. E. y Tucker K. L., Bioch. and Biophys. Res. Commun. 77, pp. 581-585, 1977).

Other methods have been disclosed by different authors (U.S. Pat. Nos. 4 668 503 and 4 479 930); U.S. Pat. No. 4 670 545 and Baidoo K. E. et al, Cancer Res. (Suppl.) 50, pp. 799s-803s, 1990).

All the BFCA present limitations, including the complexity of radiolabeling procedure, the time required to accomplish radiolabeling, and the introduction and presence of substances which may affect the integrity, stability and immunological recognition of the protein.

The other general approach is direct labeling, consisting in using a reducing agent (SnCl_2 , 2-mercaptoethanol (2-ME), dithiothreitol (DTT), ascorbic acid (AA) and the like) to reduce the disulfide bonds of the cystein residues of the protein to a sulfhydryl groups (SH), which can easily bind ^{99m}Tc due to their high capacity of forming coordination complexes.

The first direct method capable of providing a strong bond between the protein and the ^{99m}Tc for "in vivo" applications was the pretinning method (U.S. Pat. No. 4 424 200). In this method the Mabs are treated with SnCl_2 with tartrate and phthalate salts (pH 5.6) during 21 hrs in nitrogen gassed atmosphere.

The solution above mentioned is used to reduce the Mabs, thereby exposing reactive SH groups, to protect the reactive SH groups of the reduced Mabs and to prevent reformation of

disulfide bonds, to reduce sodium pertechnetate and to complex the reduced ^{99m}Tc and transfer it to the sulfide (SH) binding sites in the reduced Mabs.

Other authors reduce the disulfide groups of the Mabs with 5 monothiols, such as 2-ME or 2-mercaptoethylamine (2-MEA) (Schwarz A. and Steinstrasser A., Journal of Nuclear Medicine 28, p. 721, 1987; European Patent Application EPO No. 0 271 806 A2). In these publications, the Sn^{2+} is used to reduce the pertechnetate and reduced ^{99m}Tc is complexed with weak ligands 10 such as phosphonates or pyrophosphates which transfer the reduced ^{99m}Tc to the high affinity binding sites of the antibody.

A modified variant of this method was described by Mather S. J. and Ellison D. ("Reduction mediated Technetium-99m labeling 15 of Monoclonal antibodies". J. Nucl. Med. 31, pp. 692-697, 1990).

Some authors use DTT to reduce the disulfide bonds of the Mab, then protect the reactive SH groups with Zn^{2+} and other sulfhydryl group derivatizing reagents and use tartrate salts 20 to complex and transfer the reduced radionuclide to the binding sites of the monoclonal antibody (US Patent No. 4 877 868; European Patent Application EPO No. 0 237 150).

Other studies have been done using this method, in which DTT is used to reduce the antibodies and tartrate or 25 glucoheptonate salts and their analogs were added as coupling agents (Pak K. Y. et al, J. Nucl. Med. 30, pp. 793, 1989; WO 88/07382).

Also Ascorbic Acid (AA) has been used to reduce the Mabs to a molar relation of 3500: 1 (AA : Mab). In this work authors 30 used solutions of sodium dithionite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) purged with nitrogen to reduce the pertechnetate and transfer it to the binding sites of the reduced Mabs, reaching labelling

efficiencies higher than 95% (Thakur M. L. et al, Nuclear Medicine Biology 18, pp. 227-233, 1991).

All the above mentioned direct methods of labeling are widely used nowadays, since the conjugation of the Mabs with
5 the BFCAs is avoided as in indirect methods, the reduction process is easily controlled without loss of the immunoreactivity of the molecule for its ligand, they can be adaptable instant to a practically instant labeling and it is reached a high labeling efficiency of 95%

10 From all direct methods of labeling, the methodology based on the use of 2-ME for quantitative labeling of Mabs with ^{99m}Tc without loss of the molecular integrity and biological activity has been well documented and actually found as the most suitable for clinical studies (Baum R. P. et al, Nucl.
15 Med. Communications 10, pp. 345-352, 1989).

Many forms of treatment of colorectal carcinomas have been used, being the surgery resection of the tumor the only one that has resulted as a cure. With the surgery high percent of survival is obtained in the cases when the tumor is detected
20 in early stages. Unfortunately the majority of cases are diagnosed in stages when metastasis have appeared.

The present strategy for increasing the survival rate, considers the diagnosis, therapy, and epidemiology. Researchers are evaluating different methods, in order to
25 obtain an early diagnosis of the disease, before the metastatic process has gained the local organs, with the possibility of surgical resection of the tumor. Likewise, the knowledge of the epidemiological factors and the development of new therapeutic methods will contribute to the increase of
30 the survival rate.

The use of monoclonal antibodies (Mabs) labeled with radioisotopes for the detection of cancer by immunoscintigraphic methods has centered the attention in the research projects during the last years. The Mabs have shown
5 enough potential to serve as carrier for the radioisotopes, and direct them to the associated tumor antigens.

The use of compositions with radiolabeled antibodies, which emit radiation at levels which can be detected after administration to the human body is well known (Mach J. P. et
10 al, Sem. in Nucl. Med. 19, pp. 262-281, 1989; Behr T. M. et al, J. Nucl. Med. 36, pp.430-441, 1995). These compositions are used to visualize and monitor functioning of various part of the human body or are utilized in the diagnosis to determine the presence or absence of particular antigens,
15 antibodies, hormones or the like.

Some radiolabeled antibodies have been utilized to detect tumors having associated therewith carcinoembryonic antigen (CEA). As disclosed in U.S. Pat. Nos. 3 663 684; 3 867 363 and
3 927 193; ^{131}I or ^{125}I labeled antibodies to CEA are used to
20 detect tumors which produce or are associated with CEA antigen. It is also well known that Mabs can be tagged with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in order to form "in vivo" diagnostic agents.

Monoclonal antibodies ior C5 are murine IgG₁ antibodies which was generated by the immunization of Balb/c mice with the
25 human colorectal cell line SW1116 (colorectal adenocarcinoma) and the fusion of splenocytes from the selected mice with SP 2/O Ag14 non-secreting myeloma murine cell line (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pp. 245-256, 1992), and which recognize an antigen expressed preferentially on the surface and in the
30 cytoplasm of malignant and normal colorectal cells. They do not recognize neither the antigens CEA, Lewis a, Lewis b,

Lewis a sialilated, nor the antigens from the membrane of the mononuclear peripheral cells, nor the red blood cells.

Western blotting studies using membrane extracts from the cell line SW1116 shown that these Mabs react with a
 5 glycoprotein complex named ior C2, composed of a 145 Kda band and a 190 Kda band. (Vázquez A. M.et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pp. 137-145, 1993).

These Mabs recognize an antigenic determinant in human normal tissues, with a pattern of restricted distribution
 10 present mostly in the gastrointestinal tract, and its embryological derivatives. All other intestinal villi are also recognized, with an homogeneous staining pattern in the large intestine. The caliciform cells and the ciliated pseudostratified respiratory epithelium of the lung
 15 bronchious are also recognized.

The immunostaining of the majority of colon adenocarcinoma cells varied markedly in intensity within the same tumor, resulting in a heterogeneous staining pattern. The staining is apical and in general stains the mucus of the caliciform
 20 cells and the intraluminally secreted material was usually positive.

The positive staining and the identification of the antigen by Western Blotting and Immunohistochemical methods in an heterogeneous group of tumor cells, its heterogeneous
 25 staining in colorectal adenocarcinoma tissues and its homogeneous expression in normal mucous in studies carried out "in vitro" suggest that:

- a)- The referred antigen is unique and is synthesized by malignant colon cells; and
- 30 b)- It can be used for the diagnosis of colorectal tumors, their metastasis and recurrences by immunoscintigraphy methods.

While peroxidase-labeled or fluorescein-labeled of antibodies ior C5 are very effective for identifying and localizing malignant cells "in vitro", these labeled compositions are not suitable for "in vivo" use because they do not allow visualization by any available immunoscintigraphic detection system and therefore, they are undesirable for widespread use because they are simplified only to immunohistochemical techniques requiring light or electron microscopy of biopsy samples for positive identification.

Other undesirable consequence of the tumor associated antigens is that the use of radiolabeled antibodies wherein the labeled antibody binds directly to cancer cells having the corresponding tumor associated antigen can cause faint and imperfect imaging of the tumor cells since the antibodies usually have a limited number of binding sites. Thus, the cell may only be able to accommodate one radiolabeled antibody molecule on a single antigen site. Thus, the density of radiolabeled molecules on the cell surface may not be sufficient to permit distinction of the cancer cells from the surrounding tissues, due to the law specificity.

Until now there is no report in the prior art describing the localization of the antigen ior C2 in tumor cells, their metastasis and/or recurrences by immunoscintigraphic methods, using monoclonal antibodies raised against this antigen and labeled with ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re and the like.

The novelty of the present invention consists in providing a composition comprising monoclonal antibodies which recognize the associated tumor antigen ior C2, in particular the monoclonal antibodies ior C5 and also the chimeric and humanized versions, and a weak ligand together with the reduction agent Sn^{2+} , in order to exchange the radioisotopes

^{99m}Tc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re and the like. This composition is useful for radioimmunotherapy and immunoscintigraphic studies of colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

Furthermore, from the data obtained from studies carried
5 out "in vivo", it is demonstrated that the pattern of biodistribution of the ior C2 antigen observed in humans after the administration of the composition of the present invention is different to that reported in previous "in vitro" studies using the Mab ior C5 (Vázquez, A. M. et al,
10 Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7, pg. 137-145, 1993). In these studies it was shown that the antigen ior C2 was present not only in normal cells but also in malignant cells. Using the composition of this invention it is possible to distinct selectively the affected cells (which are only the
15 labeled) in respect to the normal cells. These results suggest that in normal cells this antigen is located within the cytoplasm and, in malignant cells, in the surface. This finding makes the present invention very useful for the detection "in vivo" of neoplasms using immunoscintigraphic
20 techniques.

Disclosure of the invention.

1. Obtainment Of The Monoclonal Antibody.

The Mabs ior C5 are highly specific murine IgG₁ isotype antibodies which recognize the C2 antigen strongly expressed
25 in the cytoplasm of normal cell and on the surface malignant colorectal cells. The Mabs ior C5 were obtained by fusion of splenocytes from Balb/c mice immunized with the human colorectal cancer cell line SW1116 and SP20 Ag 14 non-secreting myeloma cells. Its generation, characterization and
30 reactivities have been described in detail elsewhere (Vázquez A. M. et al, Hybridoma 11, pp. 245-256, 1992). The secreting

hybridoma of this Mabs has been deposited under regulations of the Budapest Treaty (Deposit number: pending)

2. Purification of the monoclonal antibodies.

These antibodies are purified from murine ascitis fluid (MAF). The MAF is filtered through the 50 mm diameter polycarbonate (Sartorius), then it is passed through a prefilter (glass fiber filter) to remove the large particles and then is passed through a 0.8 and 0.45 μ m cellulose acetate membrane.

The MAF is diluted with an equal volume of glycine buffer 1.5 M, NaCl 3M pH 8.9 and for the purification a column XK 26/20 (5.3 cm² area) pre-packed with 50 ml of Protein A gel Sepharose 4 Fast Flow and equal volume of MAF and buffer is applied. Elution should be performed at a flow rate of 80 cm/ml (7 ml/min).

The column is previously equilibrated with at least 5 bed volumes. After the application, the column is washed with 5-10 bed volumes of gel of the previous buffer. Elution is performed using Citrate buffer (citric acid) 0.1 M pH 6.0 applied at a flow rate of 60 cm/hr (5,3 ml/min) and the column is regenerated with citrate buffer 0.1 M pH 3.0 at a flow rate of 80 cm/hr.

The eluted fraction is further passed through the column XK 50/30 packed with Sephadex G-25 M in phosphate buffered saline (PBS) and the eluted fraction from this step is filtered through a 0.22 μ m filter in aseptic conditions under a laminar flow.

At the end the collected fractions from 8 different batches are mixed and concentrated in an hemodialysis cartridge until the concentration of the antibody reaches the value of 5 mg/ml, determined by measuring the optical density (OD) at 280 nm. To the purified Mabs the following quality control

procedure are performed: protein concentration by Lowry Method, protein concentration by OD at 280 nm, biological activity by competitive ELISA method, purity determination by electrophoresis, isoelectric focusing (isoelectric point) and
 5 the stability of the Mabs is measured.

3. Obtainment Of The Chimeric Monoclonal Antibody.

Molecular Cloning Sequencing:

VH and VK chains were amplified using Polimerase Chain Reaction (PCR) and specific oligonucleotides. The purified VH
 10 and VK cDNA were cloned into M13 vector. Twelve independents clones were sequenced by the dideoxy method using T7 DNA Pol (Pharmacia). The VH and VK sequences are most highly related to Kabat subgroups two.

Construction of chimeric genes:

15 The cDNA is reamplified by PCR using specific oligonucleotides. The amplified cDNAs were digested with PstI and BstEII for the VH gene or PvuII and BglIII for the VK gene. The fragments were cloned into M13-VHPCR1 (digested with PstI and BstEII) or into M13-VKPCR1 (digested with PvuII and BclI).
 20 Details of vectors are referred by Orlandi, R et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). The M13VHPCR-C5 and M13VKPCR-C5 containing V gene inserts were identified directly by sequencing.

The VH gene together with the Ig heavy chain promoter,
 25 appropriate DNA splicing sites and signal peptide sequences were excised from M13 vectors by digestion with HindIII and BamHI and cloned into an expression vector (pSVgpt). Then, the human IgG1 constant region (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) was added as a BamHI fragment. The resultant
 30 construction was C5VH-pSVgpt. The construction of the C5VK-pSVhyg was essentially the same except that the gpt gene was replaced by the hygromycin resistance gene and a human Kappa

chain constant region was added (Heiter, P. A. et al, Cell 22:197-207, 1980).

Expression of the chimeric and humanized vector in NSO cells:

5 NSO cells were electroporated with 4 μ g of chimeric C5VH-CMMAR gamma 1 region and 8 μ g of chimeric C5VK-CMMARhyg kappa constant region were liberated by digestion with PVUI. The DNAs were mixed together, ethanol precipitated and dissolved in 25 μ l water. Approximately 10^7 NSO cells were grown to
10 semiconfluency, harvested by centrifugation and resuspended in 0.5 ml DMEN together with the digested DNA in an electroporation cuvette. After 5 minutes on ice, the cells were given a pulse of 170 volts and 960 μ F (Gene-Pulser, Bio-Rad) and left in ice for further 30 minutes. The cells were
15 put into 20 ml DMEN plus 10% fetal calf serum and allowed to recover for 48 hours. At this time the cells were distributed into 96-well plate and selective medium applied (DMEN, 10 % fetal calf serum, 0.8 μ g/ml mycophenolic acid, 250 μ g/ml xanthine). Transfected clones were visible with the naked eyes
20 14 days later.

The presence of chimeric and humanized antibodies in the medium of wells containing transfected clones was measured by ELISA. Microtiter 96 well plates for ELISA were coated with goat anti-human IgG (gamma chain specific) antibodies (Sera
25 Lab). After washing with PBST (phosphate buffered saline containing 0.02 % tween 20, pH 7.5), 20 μ l of culture medium from the wells containing transfectants were added to each microtiter well for 1 hour at 37°C.

The wells were then washed with PBST and peroxide-conjugated
30 goat anti-human Kappa, light chain specific (Sera-Lab), were added and incubated at 37°C for one hour. The wells were then emptied, washed with PBST and substrated buffer containing o-

phenyldiamine added. Reactions were stopped after a few minutes by the addition of sulphuric acid and absorbance at 492 nm was measured.

**4. Obtainment and utilization of a radiolabeled composition
5 for diagnosis and/or therapy of colorectal tumors.**

The radiolabeled composition of the present invention is obtained using the following methodology.

The ior C5 antibodies concentrated by ultrafiltration on Centricon-30 (Amicon, MA) in phosphate buffered saline (PBS) were reduced by the method described in the European Patent Application EP No. 0 271 806 A2, by a reduction with 2-mercaptoethanol (2-ME) at molar ratio of 2000:1 (2-ME:MABs) at room temperature for 30 min. The reduced antibodies were purified to eliminate the excess of 2-ME on Sephadex G-25 M column (Pharmacia Biotech, Sweden) using PBS (pH 7.4) purged with nitrogen as mobile phase. 2 ml fractions were collected and reduced antibodies concentration determined measuring the OD at 280 nm on a UV/visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech). Protein concentration at the peak was of 2.5-5.0 mg/mL.

Aliquots containing 1-10 mg of reduced antibodies were dispensed into 10 ml vials and instantaneously frozen with liquid nitrogen. To the above solution 50-100 μ l volume of MDP bone-scanning kit (Amersham Medronite II containing 5 mg of medronic acid, 0,34 mg of stannous fluoride and 2 mg of sodium p-aminobenzoic, Amersham, UK) dissolved in 5 ml of sodium chloride purged with nitrogen were added per mg of antibody reduced to give MDP, stannous fluoride and p-aminobenzoic acid concentrations of 50-100, 3.4-6,8 and 20-40 μ g respectively per mg of antibody. The solution with the reduced Mabs and the weak ligand was frozen with liquid

nitrogen again. Then the frozen products were lyophilized for 24 hrs, sealed under vacuum and stored at 4°C until use.

The composition of the present invention contains two basic components:

5 1. The monoclonal antibodies ior C5, its chimeric and humanized versions, fragments and/or derivatives of them.

2. A reducing agent capable of reducing ^{99m}Tc from the (7⁺)Tc to Tc (5⁺), Tc (4⁺) and a weak ligand to transfer the ^{99m}Tc to the antibody.

10 The main advantages of the composition according to the present invention are those that the reagents include a reducing agent to reduce the ^{99m}Tc from the oxidation state 7⁺ to a lower oxidation state 5⁺, 4⁺ or 3⁺, which are physiologically acceptable and thus, a process of interchange
15 with the weak ligand will occur, binding the ^{99m}Tc or its analogues to the antibody preparation. The ^{99m}Tc should be added to the composition by the user previous administration to humans.

The use of ^{99m}Tc provides excellent quality of the images by
20 immunoscintigraphic methods. The ^{99m}Tc is retained by the Mabs by a chelating mechanism and the radiopharmaceutical is formed under reduction conditions to minimize or prevent the irreversible reaction by which the ^{99m}Tc is detached from the Mabs. The ^{99m}Tc can be obtained as sodium pertechnetate from a
25 conventional $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator. Any kind of ^{99m}Tc source with pharmaceutical quality can be used in the present invention.

5. Obtainment of the pharmaceutical composition.

The pharmaceutical composition of the present invention is obtained using the following methodology:

30 The antibodies ior C5 concentrated by ultrafiltration on Centricon-30 (Amicon, MA) in phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4 was reduced (following the method described by Schwarz

and Steinstrasser, 1987 and modified by Mather and Ellison, 1990) with 2-mercaptoethanol (2-ME) at molar ratio in excess of 2000:1 (2-ME:MABs) at room temperature for 30 min. The reduced antibody was purified to eliminate the excess of 2-ME
5 on a Sephadex G-25 M column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using PBS (pH 7.4) purged with nitrogen as mobile phase. 2 ml fractions were collected and the concentration of the reduced antibody was determined measuring the OD at 280 nm on a UV/visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech). The
10 protein concentration was found to be 2.5-5.0 in the peak.

Aliquots containing 1-10 mg of reduced Mabs were dispensed into 10 ml vials and instantaneously frozen with liquid nitrogen. To the above solution, 50-100 μ l volume of MDP bone-scanning kit (Amersham Medronite II containing 5 mg of
15 medronic acid, 0,34 mg of stannous fluoride and 2 mg of sodium p-aminobenzoic, Amersham, UK) dissolved in 5 ml of sodium chloride purged with nitrogen were added per mg of antibody reduced to give MDP, stannous fluoride and p-aminobenzoic acid concentrations of 50, 3.4 and 20 μ g
20 respectively per mg of antibody.

This solution that contains the reduced Mabs and the weak ligand can be used lyophilized (Kit before mentioned) or can be prepared instantly. For radiolabeling, the solution is reconstituted with 0.1-100 mCi (3.7 -3700 MBq) of $^{99m}\text{TcO}_4$ (per
25 each mg of Mabs) as eluant from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator (Elumatic II Amersham, UK), then the solution is allowed to stand for 15 minutes at room temperature to achieve a high efficiency of labeling.

Quality control of the radiolabeling.

30 Quality control of the radiolabeled product is performed by paper chromatography on Whatman 3 MM.

6. Radiolabeling of Fragments.

The F(ab')₂ Mabs fragments can also be labeled by the method described above. The F(ab')₂ fragment can be obtained by digestion of the Mabs with pepsin following a chromatographic purification step to separate the fragments
5 F(ab')₂ from the rest of the byproducts resulting from the pepsin digestion.

After the purification step, the sulfide bonds of the fragments should be reduced following the method described before, after that, the reduced fragments are purified by a
10 gel filtration column PD-10 Sephadex G-25 M to eliminate the excess of 2-ME, the concentration of the reduced fragments is determined by measuring the optical density of the solution at 280 nm as was described above. The number of SH groups per molecule of fragment is determined, the reduction solution
15 for the sodium pertechnetate is added and at the end the desired quantity of sodium pertechnetate is added.

7. Determination of the immunoreactivity of the reduced Mabs.

In the present invention a competitive ELISA system with
20 the antigen is used and the native (non-reduced) and reduced Mabs are compared using standard curves with decreasing concentrations of the Mabs. The affinity constants of the native and reduced antibody for the concentrations at 50 % of inhibition of the antigen binding are calculated and
25 compared.

By this method it can be determined that the reduction process of the antibodies and their fragments with 2-ME, following a purification step by the gel filtration column PD-10 Sephadex G 25 M does not affect the immunoreactivity of
30 the antibodies and its fragments, nor its reactivity with the antigen, nor promote structural changes in the integrity of the molecule.

8. Monitoring of the pharmaceutical composition.

The selective binding of the pharmaceutical composition to colorectal tumoral cells, their metastasis and recurrences which express ior C2 antigen, once it is administered
5 intravenously to humans is monitored by immunoscintigraphic methods by the Gamma Camera.

Planar scans have to be performed on a Gamma Camera. Anterior and posterior scans of head, thorax, pelvis and liver are acquired at 1, 2, 3, 5 and 24 hours post-injection
10 using a statistic of 700 000 counts per acquisition. All images were stored on the computer in a 128x128 word mode matrix.

The accumulation of the Mab ior C5 in the tumoral cells is determined by these immunoscintigraphic planar images with
15 anterior and posterior views.

9. Monitoring of the biodistribution of the composition.

The biodistribution in normal organs of the composition of the present invention is monitored by the whole body scans acquired on a Gamma Camera, fitted with a medium-energy high-
20 resolution, collimator to increase the lateral viewing aspect. Images are acquired using a 20% window centered on the 140 Kev emission from ^{99m}Tc following injection.

Anterior and posterior whole-body scans are acquired at 10 min, 1, 3, 5 and 24 hrs post-injection of the
25 radiopharmaceutical using a gantry speed of 20 cm/min; acquisition times are around 20-25 min each. All whole body images are stored on the computer in a 512x2048 word mode matrix.

The invention is now described by the following examples.

30 **EXAMPLE 1: Preparation of the monoclonal antibodies ior C5.**

The Mabs ior C5 are murine IgG1 isotype and were obtained by fusion of splenocytes from Balb/c mice immunized with the

human colorectal cancer cell line SW1116 and SP20 Ag 14 non-secreting myeloma cells and were purified by affinity chromatography on Protein A Sepharose 4 Fast Flow.

The hybridoma producer of said monoclonal antibodies has been deposited under regulations of the Budapest Treaty (Deposit number: pending).

EXAMPLE 2. Obtainment Of The Chimeric Monoclonal Antibodies.

- Molecular Cloning Sequencing:

VH and VK chains were amplified using Polimerase Chain Reaction (PCR) and specific oligonucleotides. The purified VH and VK cDNA were cloned into M13 vector. Twelve independent clones were sequenced by the dideoxy method using T7 DNA Pol (Pharmacia). The VH and VK sequences were most closely related to Kabat 2 subgroups.

- Construction of chimeric genes:

The cDNA was reamplified by PCR using specific oligonucleotides. The amplified cDNAs were digested with PstI and BstEII for the VH gene or PvuII and BglII for the VK gene. The fragments were cloned into M13-VHPCR1 (digested with PstI and BstEII) or into M13-VKPCR1 (digested with PvuII and BclI). Details of vectors are referred by Orlandi, R et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837, 1989). The M13VHPCR-C5 and M13VKPCR-C5 containing V gene inserts were identified directly by sequencing.

The VH gene together with the Ig heavy chain promoter, appropriate splicing sites and signal peptide sequences were excised from M13 vectors by digestion with HindIII and BamHI and cloned into an expression vector (pSVgpt). Then, the human IgG1 constant region (Takahashi, N. et al. Cell 29:718-749, 1982) was added as a BamHI fragment. The resultant

construction was C5VH-pSVgpt. The construction of the C5VK-pSVhyg was essentially the same except that the gpt gene was replaced by the hygromycin resistance gene and a human Kappa chain constant region was added (Heiter, P. A. et al, Cell
5 22:197-207, 1980)

- Expression of chimeric and humanized vectors in NSO cells:

NSO cells were electroporated with 4-8 μ g of chimeric C5VH-CMMAR gamma 1 region and 8-16 μ g of chimeric C5VK-CMMARhyg
10 kappa constant region were linearized by digestion with PvuI. The DNAs were mixed together, ethanol precipitated and dissolved in 25 μ l water. Approximately 10^7 NSO cells were grown to semiconfluency, harvested by centrifugation and resuspended in 0.5 ml DMEN together with the digested DNA in
15 an electroporation cuvette. After 5 minutes on ice, the cells were given a pulse of 170 volts and 960 μ F (Gene-Pulser, Bio-Rad) and left in ice for a further 30 minutes. The cells were placed in 20 ml DMEN plus 10% fetal calf serum and allowed to recover for 48 hours. At this time the cells were distributed
20 into 96-well plate and selective medium applied (DMEN, 10 % fetal calf serum, 0.8 μ g/ml mycophenolic acid, 250 μ g/ml xanthine). Transfected clones were visible with the naked eyes 14 days later.

The presence of chimeric and human antibodies in the medium
25 of wells containing transfected clones was measured by ELISA. Microtiter plate wells were coated with goat anti-human IgG (gamma chain specific) antibodies (Sera Lab). After washing with PBST (phosphate buffered saline containing 0.02% tween 20, pH 7.5), 20 μ l of culture medium from the wells
30 containing transfectants were added to each microtiter well for 1 hour at 37°C.

The wells were then washed with PBST and peroxide-conjugated goat anti-human Kappa, light chain specific (Sera-Lab) were added and incubated at 37°C for one hour. The wells were then emptied, washed with PBST and substrate buffer 5 containing o-phenyldiamine added. Reactions were stopped after a few minutes by the addition of sulphuric acid and absorbance at 492 nm was measured.

EXAMPLE 3 : Process of obtainment of the radiolabeled composition by a direct labeling method.

10 The Mabs ior C5 obtained following the procedure of the Example 1 were reduced in PBS pH 7.4 (European Patent Application EP 0 271 806 A2) by a reduction with 2-mercaptoethanol (2-ME) at molar ratio in excess of 2000:1 (2-ME:Mabs) at room temperature for 30 min. The reduced antibody 15 was purified to eliminate the excess of 2-ME on a Sephadex G-25 M column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using PBS (pH 7.4) purged with nitrogen as mobile phase. 2 ml fractions were collected and the concentration of the reduced antibodies determined measuring the OD at 280 nm on a 20 UV/visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech). The protein concentration was found to be 2.5-5 in the peak.

Aliquots containing 1-10 mg of the reduced antibodies were dispensed into 10 ml vials and instantaneously frozen with liquid nitrogen. To the above solution 50 µl volume of MDP 25 bone-scanning kit (Amershan Medronite II, containing 5 mg of medronic acid, 0,34 mg of stannous fluoride and 2 mg of sodium p-aminobenzoic, Amersham, UK) dissolved in 5 ml sodium chloride purged with nitrogen were added per mg of reduced antibody to give MDP, stannous fluoride and p-aminobenzoic 30 acid concentrations of 50-100, 3.4-6,8 and 20-40 µg respectively per mg of antibody. The solution with the reduced Mabs and the weak ligand was frozen with liquid

nitrogen again. Then the frozen products were lyophilized for 24 hrs, sealed under vacuum and stored at 4°C until use.

EXAMPLE 4 : Obtainment of the pharmaceutical composition.

The pharmaceutical composition of the present invention is
5 obtained using the following methodology:

The antibodies for C5 obtained by the procedure of Example 1 were reduced in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 with 2-mercaptoethanol (2-ME) at molar ratio of 2000:1 (2-ME:Mabs) (European Patent Application EP 0 271 806 A2) at
10 room temperature for 30 min. The reduced antibody was purified to eliminate the excess of 2-ME on a Sephadex G-25 M column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using PBS (pH 7.4) purged with nitrogen as mobile phase. 2 ml fractions were collected and the concentration of the reduced antibody
15 was determined measuring the OD at 280 nm on a UV/visible spectrophotometer (Pharmacia Biotech). The protein concentration was found to be 2.5-5.0 in the peak.

Aliquots containing 1-10 mg of antibodies were dispensed into 10 ml vials and instantaneously frozen with liquid
20 nitrogen. To the above solution 50 µl volume of MDP bone-scanning kit (Amersham Medronite II, containing 5 mg of medronic acid, 0,34 mg of stannous fluoride and 2 mg of sodium p-aminobenzoic, Amersham, UK) dissolved in 5 ml of sodium chloride purged with nitrogen were added per mg of
25 reduced Mab to give MDP, stannous fluoride and p-aminobenzoic acid concentrations of 50-100, 3.4-6,8 and 20-40 µg respectively per mg of antibody.

This solution that contains the reduced Mabs and the weak ligand can be used lyophilized (Kit before mentioned) or can
30 be prepared instantly. For radiolabeling, the solution is reconstituted with 0.1-100 mCi (3.7-3700 MBq) of ^{99m}TcO₄ (per each mg of reduced Mabs) as eluant from ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator

(Elumatic II Amersham, UK), then the solution is allowed to stand for 15 minutes at room temperature to obtain a high labeling efficiency.

EXAMPLE 5 : Radiolabeling of fragments F(ab')₂ of the Mab
5 **ior C5.**

The fragments F(ab')₂ were obtained by digestion of the Mab with pepsin following a chromatography purification to purify fragments F(ab')₂ from the rest of subproducts obtained from the pepsin digestion. The recovery after the purification was
10 more than 95%.

The method described in the Example 3 was used for the reduction of disulfide bonds of the fragment, and then the fragments were further purified in a gel filtration column PD-10 Sephadex G-25 M and the reduction solution of
15 pertechnetate was used.

EXAMPLE 6: Determination of the immunoreactivity of the reduced Mabs.

This example shows that in the present invention using 2-ME as a reducing agent from the Example 2 following a reduction
20 step by a gel filtration column PD-10 Sephadex G-25 M, does not affect the Mabs immunoreactivity.

A competitive ELISA with the antigen was used and the native (non-reduced) and reduced monoclonal antibodies were compared using standard curves with decreasing concentration
25 of the Mabs. The affinity constants of the concentration corresponding to the 50% inhibition of the antigen binding was calculated. Similar values of affinity for both preparations of non-reduced and reduced antibody were found.

EXAMPLE 7: Binding of ^{99m}Tc-labeled antibodies ior C5 to the
30 **colorectal cancer cells.**

The planar images with anterior and posterior view of the head, thorax, liver and pelvis were performed in a Gamma

Camera. Images at 1, 2, 3, 5 and 24 hrs were acquired using a statistic of 700 000 counts per acquisition.

The images were stored in a computer in a 128x128 word matrix for its posterior use in all calculations. The
5 accumulation of the Mabs ior C5 in colon tumoral cells was determined by these immunoscintigraphic images in anterior and posterior planar views.

The images obtained in the periods time stated above show clearly that the monoclonal antibodies of the present
10 invention can be detected during the first three hours after the administration of the radiopharmaceutical composition in ascendant and descendant colon tumors, in the rectal channel and also in metastases in liver and the splenic angle. These lesions have not been observed previously by other imaging
15 methods such as X-rays, ultrasound, computerized axial tomographic (CAT Scans) and nuclear magnetic resonance (NMR). The high selectivity of these monoclonal antibodies for colorectal tumors, their metastasis and recurrences makes it possible to observe in the lesion, 24 hours after the
20 administration of the radiopharmaceutical, 1-3% of the injected dosis per 100 g of tumor.

EXAMPLE 8 : Normal organ biodistribution of ^{99m}Tc-labeled antibodies ior C5.

Whole body scans were performed on a Gamma Camera, fitted
25 with a medium-energy high-resolution, collimator to increase the lateral viewing aspect. Images were acquired using a 20 % window centered on the 140 Kev emission from ^{99m}Tc. Anterior and posterior whole-body scans were acquired at 10 min, 1, 3, 5 and 24 hrs post-injection of the radiopharmaceutical using
30 a gantry speed of 20 cm/min; acquisition times were around 25 min each. All whole body images were stored in the computer in a 512x2048 word mode matrix for later processing

With the aid of the regions of interest drawn over the main source organs, the biodistribution patterns of the normal organs were determined, demonstrating that during the first 5 hrs after the administration of the radiopharmaceutical most of the activity remained in the blood pool and the parenchymatous organs. Only a low percent of the injected activity was excreted during the first hours by the urine.

Between 1 and 5 hours a good contrast was observed in lungs, liver and kidneys, also a decrease of the perfusion of the peripheral muscles, but the blood pool activity remained high. The late images taken at 24 hr after injection showed a relatively low activity in the blood pool and in the whole body (Table 1).

Table 1: Normal organ biodistribution of the ^{99m}Tc-labeled
Mabs ior C5.

SOURCE ORGAN	% OF INJECTED DOSES				
	10 min.	1 hr.	3 hrs.	5 hrs.	24 hrs.
Heart	7.9	6.8	4.5	3.8	0.3
Liver	9.4	8.3	6.0	5.3	0.6
Spleen	1.4	1.2	0.5	0.7	0
Kidneys	3.7	3.6	2.4	2.6	0.2
Bladder	0.5	0.4	0.4	0.8	0.0
Lungs	4.0	3.5	2.3	2.05	0.1
Remainder of body	67.9	58.8	48.0	38.5	1.0
Whole Body	100	87.0	67.7	56.5	2.6

5 With these data obtained in "in vivo" studies it is
demonstrated that the pattern of biodistribution of the
antigen C2 observed in humans after the administration of the
composition of the present invention, is different to that
reported in previous in vitro studies using the Mab ior C5
10 (Vázquez, A. M. et al, Year Immunol., Basel, Karger, vol. 7,
pg. 137-145, 1993). In those studies it was shown that the
antigen ior C2 was present not only in normal cells but also
in malignant cells. Using the composition of this invention
it is possible to distinct selectively the affected cells
15 (which are only the labeled) from the normal cells. These
results suggest that in normal cells this antigen is located
within the cytoplasm and in malignant cells, on the surface.
This finding makes the present invention very useful for the

"in vivo" detection of neoplasms using immunoscintigraphic techniques.

This Page Blank (uspto)

CLAIMS

1. Monoclonal antibodies which recognize the antigen ior C2 present on malignant colorectal tumoral cells, or epitopes thereof, or a mixture of them, or any tumor associated
5 antigen related to C2 obtained characterized in that they are useful for the diagnosis or treatment of colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

2. Monoclonal antibodies according to claim 1 characterized in that they are the murine monoclonal antibodies C5 as well
10 as any chimeric or humanized variant obtained from them.

3. Monoclonal antibodies according to claims 1 and 2 characterized in that the murine monoclonal antibodies ior C5 are obtained from the hybridoma of the same name (Deposit number: pending).

15 4. Monoclonal antibodies according to claim 1 characterized in that they are the anti-idiotypic monoclonal antibodies generated by the monoclonal antibodies of claim 2.

5. Monoclonal antibodies according to claim 1 characterized in that they are the anti-antiidiotypic monoclonal antibodies
20 which recognize the antigen ior C2.

6. Use of the monoclonal antibodies of claims 1 to 5 for the manufacture of a pharmaceutical composition useful in the treatment of malignant colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

25 7. Use of the monoclonal antibodies of claims 1 to 5 for the manufacture of a composition useful in the "in vivo" localization e identification of malignant colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

8. Pharmaceutical composition for the treatment of
30 malignant colorectal tumors, their metastasis and recurrences, characterized in that it contains one of the

monoclonal antibodies of claims from 1 to 5 and a suitable excipient for its application.

9. Composition according to claim 8 characterized in that it contains fragments of said antibodies or other transformations obtained thereof.

10. Composition for the "in vivo" localization and identification of malignant colorectal tumors, their metastasis and recurrences, characterized in that it contains one of the monoclonal antibodies of claims from 1 to 5.

10 11. Composition according to claim 10 characterized in that it also contains reagents for the radiolabeling of said antibodies which are mixed with the antibodies to produce an administrate aqueous solution.

15 12. Composition according to claim 11 characterized in that the radioisotopes can be technetium-99m, rhenium-186, rhenium-188 and/or their analogues.

13. Method for the "in vivo" diagnosis of malignant colorectal tumors, their metastasis and recurrences characterized by the administration of a physiologically acceptable composition containing any of the antibodies of the claims from 1 to 5 previously labeled with ^{99m}Tc or their analogues and the monitoring of the biodistribution of said composition by immunoscintigraphic methods.

20

ABSTRACT

The present invention is related with the field of Nuclear Medicine and particularly with the application of the ior C5
5 monoclonal antibody for the diagnosis and therapy of colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

In accordance with the aforementioned the present invention provides a pharmaceutical composition containing monoclonal antibodies that recognize the antigen ior C2 and a weak
10 ligand which contains the reducing agent Sn^{2+} to reduce $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{186}Re , ^{188}Re -and the likes to low oxidation states, useful for the Immunoscintigraphic and Radioimmunotherapy (RAIT) of colorectal tumors, their metastasis and recurrences.

This Page Blank (uspto)